

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2004～2008

課題番号：16085205

研究課題名（和文）植物の重力感受と形態に関連した液胞機能を支える分子ネットワークの解明

研究課題名（英文）Research of genetic network for vacuolar function involved in gravity perception and morphology in Arabidopsis.

研究代表者

森田（寺尾） 美代 （MORITA T. MIYO）

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：10314535

研究成果の概要：我々はシロイヌナズナの環境適応戦略の一つである重力屈性において、小胞輸送が支える液胞機能が重力感受に必要であることを見いだした。本研究では、液胞やそれに至る輸送系が、どのようにして重力屈性や形態形成などの高次機能に関与するのか、より具体的に分子レベルで理解することを目的として、主に分子遺伝学的な手法で研究を行った。その結果、複数の新たな小胞輸送関連因子を単離し、その機能の一端を解明した。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|------|------------|
| 2004 年度 | 30,400,000 | 0 | 30,400,000 |
| 2005 年度 | 13,000,000 | 0 | 13,000,000 |
| 2006 年度 | 13,000,000 | 0 | 13,000,000 |
| 2007 年度 | 13,000,000 | 0 | 13,000,000 |
| 2008 年度 | 17,400,000 | 0 | 17,400,000 |
| 総計 | 86,800,000 | 0 | 86,800,000 |

研究分野：植物生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：植物、環境応答、重力屈性、小胞輸送、液胞

1. 研究開始当初の背景

植物は固着生活をおくるため、環境の変化を非常に鋭敏に認識し、器官形成や成長の制御を行うことで環境の変化に対応している。我々は高等植物の環境適応戦略の一つである重力屈性の分子機構について、シロイヌナズナを用いた分子遺伝学的なアプローチを中心に研究を進めてきた。その過程で、2つの SNARE 蛋白質 (ZIG/VTI11, SGR3/VAM3/SYP22) およびそれらの間での相互作用が、重力感受に必要であることを明らかにした。これらの SNARE 蛋白質は、トランスゴルジ網(TGN)とエンドソームや液胞間の輸送（ポストゴルジ輸送）に関与すると

考えられている。我々は、この他に液胞膜蛋白質(SGR2)を欠損した重力屈性変異体の解析からも、植物細胞の特徴的な多機能オルガネラである液胞に、重力感受という極めて高次の新規機能があることを明らかにしていた。また変異体が異常形態を示す事から、植物形態とポストゴルジ輸送の関連も強く示唆されていた。

当時真核細胞における小胞輸送研究は、出芽酵母を用いた遺伝学的・生化学的解析を基礎として、動物細胞を用いた研究が大きく発展していた。一方で、高等植物ではシロイヌナズナゲノム情報に基づき、T-DNA やトランスポゾンを用いた遺伝子破壊システムの整備が

進み、主に逆遺伝学的方法論で小胞輸送研究が行われていた。しかし、小胞輸送関連遺伝子の多くでは欠損変異体が胚あるいは芽生えで致死になったり、逆に重複遺伝子の存在により単独変異では明瞭な表現型が見られないなど、個体レベルでの研究を行う上での問題点が明らかになっていた。そこで、重力屈性研究の過程で得られたが小胞輸送による液胞形成を介して重力屈性や形態形成といった高次機能に關与することを明らかにしたことから、この変異体を用いることで液胞への小胞輸送を分子遺伝学的に解析することが可能であると着想するに至った。

2. 研究の目的

zig-1 は重力屈性異常に加えて花茎の形態異常も示す。内皮細胞特異的に *ZIG* を発現させることにより重力屈性はほぼ完全に相補されたが、花茎の形態異常は相補されない。これに着目し、*zig-1* のそれぞれの表現型を独立にもしくは同時に抑制することのできるサブレッサー変異体を単離した。重力屈性のみを抑制する変異は内皮細胞での重力感受に特異的に關わる遺伝子に、形態異常を抑制する変異は内皮以外の組織で形態形成に特異的に關わる遺伝子に、それぞれ入ると期待された。特に、表現型をすべて抑制する変異は、*ZIG/VTI11* が關わる小胞輸送経路周辺で機能する遺伝子に起こると予想された。そこで、本研究ではとくに *zig-1* の表現型全般を抑圧するサブレッサー変異の原因遺伝子の同定及び解析を行うことで、液胞に至る小胞輸送にかかわる分子ネットワークの一端を明らかにすることを目的とした。また、重力屈性において *zig-1* と同様の表現型を示す *sgr2-1*, *sgr8* の原因遺伝子についてもその機能解析を行い、高等真核生物に保存されながらその機能が明らかでないこれらの因子の機能の解明を目指した。*sgr2* については、サブレッサー・エンハンサー変異体の単離・解析を進め、*SGR2* の機能解析にも取り組んだ。

さらに、これらの遺伝子はいずれも植物全体で発現するが、重力感受における機能は重力感受細胞である内皮細胞に限定されることを明らかにしていた。また、内皮細胞での液胞の機能および液胞膜の動的性質が、平衡石として機能すると考えられているアミロプラストの重力方向への移動に大きく影響を及ぼすことも把握していた。このことから、*zig* を中心とした遺伝学的解析は、重力感受という高次機能に關連するアミロプラストや液胞などのオルガネラダイナミクスを担う分子機構の解明につながるという視点からも研究を開始した。

3. 研究の方法

zig-1 及び *sgr2* のサブレッサー・エンハンサーの単離については、当時既に進めており、数株のサブレッサー変異体を得ていた。さらにより多くの変異体を得るため、それぞれの変異体を変異源処理した M2 集団のスクリーニングを更に進めた。

原因遺伝子の同定は、マッピングにより行った。サブレッサー・エンハンサー変異の同定には、常に遺伝的背景に第一の変異 (*zig* もしくは *sgr2*) が存在する必要があるため、マッピングに使用するエコタイプが異なりかつ第一の変異を持つアレルを用いた。エコタイプが違くと表現型の表れ方も異なったことから、マッピングに用いる特殊な染色体背景を持つ系統を作成した。我々は効率的なマップベースクローニングを行うため、シロイヌナズナのエコタイプ間の多型を検出する PCR マーカーをゲノム全長にわたり整備し、これらを検索するデータベースおよび新規マーカーを容易に作成するソフトウェアを独自に開発しており、これを使用した。

研究を進める上で、重力屈性能や液胞及びアミロプラストなどのオルガネラ動態を表現型として詳細に観察する必要があった。そこで、前者の解析系として、人工気象器内で自動的に重力屈性反応をタイムラプス撮影できるシステムを立ち上げた。また、後者の解析系として、共焦点顕微鏡システム (FV1000) を導入した。さらに重力方向を保って観察する vertical microscope をこれまでに構築していたが、明視野像と蛍光像しか観察できなかった。そこで、vertical microscope に装着可能な共焦点装置 (CSU10) および高感度 EMCCD カメラを導入した。これにより、オルガネラ動態解析の分解能が劇的に改善された。

また、VTI ファミリー蛋白質と VAM3/SYP22 の SNARE 複合体形成を検出するための、免疫沈降法を改良し、再現性を向上させた。

4. 研究成果

重力感受における液胞膜の動的構造の重要性に着目し、内皮細胞のアミロプラスト・液胞膜の重力刺激に応答した動態を生きた細胞の中で観察する系を構築した。色素体移行シグナルや液胞膜蛋白質を融合させた GFP を感受細胞である内皮細胞特異的に発現させ、アミロプラストや液胞膜を可視化した形質転換植物を用いた。この系を利用して、野生型植物および変異体の詳細な細胞学的生理学的研究を行い、重力感受において重要なアミロプラストの動きの成分を明らかにし、また液胞動態の重要性を示した。研究成果を Plant Cell 誌に発表した。

カーネギー研究所の Chris Somerville 教授らとの共同研究により、重力屈性能の低下した *sgr8* 変異体の原因遺伝子が、線虫やシ

ヨウジョウバエでエンドサイトーシスに関わるとされる Rme-8 のホモログをコードすることを明らかにした。共同研究の成果を *Plant Physiology* 誌に発表した。SGR8 は約 2500 アミノ酸からなる分子量の大きな蛋白質である。この機能解析を始めるにあたり、長鎖 DNA の簡易改変法として知られるファージ由来の組換え酵素を利用した大腸菌内での Recombineering を、植物研究に用いられるバイナリーベクターに応用することに成功した。

SGR2 は液胞膜に局在する phospholipase A1 (PLA1) 様タンパク質をコードする。SGR2 の酵素活性の有無を調べた。SGR2 を発現させた昆虫細胞 (Sf9) の膜画分を調製して解析に用いた。基質として、sn-2 の脂肪鎖が NBD あるいは BODIPY で蛍光標識されたリン脂質 (フォスファチジルエタノールアミン(PE)、フォスファチジン酸(PA)、フォスファチジルコリン(PC)) を用いた。この系では SGR2 蛋白質は PC, PA, PE いずれのリン脂質に対しても PLA1 活性を示すことが判った。活性中心にアミノ酸置換変異を持つ *sgr2* 変異体アリルは、スルアリルと同様に重力屈性能を失うことから、SGR2 の PLA1 活性はその生理機能に必須であることがわかった。SGR2-GFP 融合タンパク質を用いた局在解析の結果、ドット状の SGR2-GFP の一部 (約 15%) が PVC に局在したものの、大部分は未同定のコンパートメントに局在していると考えられた。*sgr2* の重力屈性を半優性に抑圧するサプレッサー変異体 *krt171* の解析から、*KRT171* 遺伝子の loss-of-function が *sgr2* を抑圧することが示された。*KRT171* のマップベースクローニングを行い同定に成功した。*KRT171* は N 末端側に膜貫通領域をもち、C 末端側に EF-hand motif を持つアシルトランスフェラーゼであることが期待された。

zig-1 の表現型を全般に抑制する優性のサプレッサー変異 *zip1* (*zigzag suppressor 1*) には ZIG/VTI11 のホモログ VTI12 におきたアミノ酸置換であることを突き止めた。*zip1* 変異によるアミノ酸置換は、VTI12 の局在パターンを変化させたと同時に、SNARE 複合体を作る相手も変化させたことが明らかになった。これにより本来は別個の機能を持つ VTI12 が、1 アミノ酸置換により ZIG/VTI11 の機能を代替するようになったと結論した。このような変異は他に例がなく、SNARE 蛋白質の機能と不可分であるにもかかわらず未だ明らかでない細胞内局在や複合体形成の特異性の決定機構に関しても重要な知見である。研究成果を *Current Biology* 誌に発表した。

zig-1 の表現型を部分的に抑制するサプレッサー変異 *zip3* は VPS35b の loss-of-function 変異体であった。VPS35b は、酵母において

prevacuolar compartment (PVC) からトランスゴルジ網 (TGN) への逆行輸送に関わるレトロマー複合体の大サブユニットの構成因子である VPS35p のホモログであると考えられている。シロイヌナズナにおいても、レトロマー複合体の大サブユニット構成因子は保存されており (VPS26a, 26b, 29, 35a, 35b, 35c)、VPS29 以外の遺伝子はゲノム中に複数コピー存在している。VPS29 の発現レベルが低下した *mag1-1* 変異が *zig-1* の変異を抑圧すること、また VPS26b の T-DNA 挿入変異もまた *zig-1* の変異を抑圧することを明らかにした。従って、VPS35b, 29, 26b は、その欠損変異が *zig* を抑圧するという共通の機能を持ち、おそらくレトロマー複合体として共に機能している可能性が強く示唆された。PVC-TGN の逆行輸送機能の低下が、VTI11 の機能欠損を抑圧する分子メカニズムに関しては、PVC-TGN 間を循環していると考えられる VTI12 が、*zip3* 変異による逆行輸送能の低下の影響でその局在を変え、VTI11 の機能を代替したことを示唆した。一方、*vps35a*, *vps35c*, *vps26a* 変異については、*zig-1* の変異を抑圧しないことを示し、VPS35 及び VPS26 のホモログ間で遺伝学的な機能が異なることを示唆した。*vps35a*, *35b*, *35c* についてさらに詳しい解析を行ない、*zig-1* 変異抑圧に関して遺伝学的には若干の機能重複があるが、分子機能としては同一ではないことを示した。この研究成果は現在論文投稿中である。

zig-1 を部分的に抑制する劣勢のサプレッサー変異 *zip4* は Adaptor protein complex-3 (AP-3) の $\mu 3$ サブユニットホモログをコードすると予測される遺伝子の loss-of-function 変異であった。この遺伝子の T-DNA 挿入変異体によっても *zig-1* の抑圧効果が確認できた。従って、AP-3 μ サブユニットの機能欠損変異が *zig-1* を抑圧したと考えられた。

zig-1 を部分的に抑制する劣勢のサプレッサー変異 *zip2* は、酵母の液胞への小胞輸送および液胞形態形成に関わるとされる HOPS 複合体の構成因子である Vps41p のホモログ VPS41 におきた 1 アミノ酸置換変異であった。*vps41* の欠損株は致死となるが、*zip2* 単独変異体は野生型と同様に生育することから、*zip2* 変異によるアミノ酸置換は VPS41 の機能を変化させることで、VTI11 の欠損を部分的に相補したと考えられた。

sgr5, *sgr9* 変異体は、*sgr2*, *zig*, *sgr8* 等の液胞形態・輸送異常変異体で見られるようなアミロプラスト沈降異常とは異なる様式で、アミロプラスト沈降異常を示すことを見出した。*sgr5* 変異体とその原因遺伝子については、*Plant Journal* 誌に発表した。SGR9 遺伝子は、C 端側に RING finger ドメインを持ち、それ以外の領域はユニークな蛋白質をコードし

ている。アミノ酸配列からは、SGR9 は E3 リガーゼとしての機能を持つことが期待された。RING finger ドメイン中の E2 との相互作用に関わるとされているアミノ酸を置換した SGR9-GFP を野生型植物に形質転換したところ、*sgr9* 変異体と同様に重力屈性異常を示したことから、この変異型 SGR9-GFP 蛋白質は優性阻害効果を持つことが分かった。また、この変異型 SGR9-GFP 蛋白質はアミロプラストに局在することから、SGR9 はアミロプラスト上で E3 リガーゼとして自身もしくは基質蛋白質の調節を介して、アミロプラスト動態制御に関わる可能性が考えられた。以上の結果は、現在論文執筆中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

- ①. 中村守貴、田坂昌生、森田 (寺尾) 美代 「高等植物における重力感受の分子機構」生物物理 49 巻 3 号, 116-121, 2009. 査読有
- ②. Dello Ioio R, Nakamura K, Moubayidin L, Perilli S, Taniguchi M, Morita MT, Aoyama T, Costantino P, Sabatini S. A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, 322 (5906): 1380-1384, 2008. 査読有
- ③. Ebine, K., Okatani, Y., Uemura, T., Goh, T., Shoda, K., Niihama, M., Morita, M.T., Spitzer, C., Otegui, M.S., Nakano, A., and Ueda, T. A SNARE Complex Unique to Seed Plants Is Required for Protein Storage Vacuole Biogenesis and Seed Development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 11, 3006-3021, 2008 査読有
- ④. 森田 (寺尾) 美代 「重力屈性から解くメンブレントラフィック」蛋白質核酸酵素 53 巻 16 号, 2308-2312, 2008 査読無
- ⑤. Morita, M.T., Saito, C., Nakano, A. and Tasaka, M. *endodermal-amyloplast less 1* is a novel allele of *SHORT-ROOT*. *Advances in Space Research*, 39, 1127-1133, 2007. 査読有
- ⑥. Yamaguchi, N., Suzuki, M., Fukaki, H., Morita, T. M., Tasaka, M., and Komeda, Y. CRM1/BIG-mediated auxin action regulates *Arabidopsis* inflorescence development. *Plant Cell Physiol.* 48, 1275-1290, 2007, 査読有
- ⑦. Morita, M.T., Sakaguchi, K., Kiyose, S., Taira, K., Kato, T., Nakamura, M. and Tasaka, M. A C2H2-type zinc finger protein, SGR5, is involved in early events of gravitropism in *Arabidopsis* inflorescence stems. *Plant J.* 47, 619-628, 2006, 査読有
- ⑧. 新濱充、森田 (寺尾) 美代、田坂昌生 「植物の重力屈性の分子機構」植物の生長調節 2006. 査読無
- ⑨. Kitazawa, D., Hatakeda, Y., Kamada, M., Fujii, N., Miyazawa, Y., Hoshino, A., Iida, S., Fukaki, F., Morita, M.T., Tasaka, M., Suge, H., and Takahashi, H. Shoot circumnutation and winding movements require gravisensing cells. *PNAS*, 102, 18742-18747, 2005. 査読有
- ⑩. Niihama, M., Uemura, T., Saito, C., Nakano, A., Sato, M.H., Tasaka, M. and Morita, M.T. (2005) Conversion of functional specificity in Qb-SNARE VT11 homologues of *Arabidopsis*. *Current Biology*, 15, 555-560 査読有
- ⑪. Saito C., Kato T., Morita M.T. and Tasaka, M. (2005) Amyloplasts and vacuolar membrane dynamics in the living graviperceptive cell of the *Arabidopsis* inflorescence stem. *Plant Cell*, 17, 548-558. 査読有
- ⑫. Silady R.A., Kato T., Lukowitz W., Sieber P., Tasaka M., and Somerville C.R. (2004) The *gravitropism defective 2* mutants of *Arabidopsis* are deficient in a protein implicated in endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *Plant Physiol.* 136, 3095-3103. 査読有
- ⑬. Morita, M.T. and Tasaka, M. (2004) Gravity sensing and signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 7/6, p712-718. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ①. Tasaka, M., Nakamura, M., Morita, M.T. Actin dynamics involved in gravity perception in *Arabidopsis* inflorescence stems. 37th COSPAR Scientific Assembly, July 13 – 20, 2008. Montreal
- ②. Nakamura, M., Tasaka, M., Morita, M.T. A possible role of a novel RING finger protein in actin remodeling within statocytes. 19th International Conference on *Arabidopsis* Research, July 23 – 27, 2008. Montreal
- ③. Nakamura, M., Tasaka, M., Morita, M.T. A novel RING finger protein, SGR9, is involved in the regulation of actin-amyloplasts interaction in *Arabidopsis* shoot gravitropism. ZOMES V November 11-14, 2008. Yokohama
- ④. 森田 (寺尾) 美代 重力屈性におけるアミロプラスト動態と重力感受. 日本植

- 物学会第 72 回大会シンポジウム 2008 年 9 月 25-27 日, 高知
- ⑤. 森田 (寺尾) 美代, 橋口泰子, 新濱充, 田坂昌生 Qb-SNARE VTI11 欠損変異 *zig* の抑圧変異体解析から見えてきたシロイヌナズナ小胞輸送ネットワーク. 第 49 回日本植物生理学会年会シンポジウム 2008 年 3 月 20-22 日, 札幌
 - ⑥. Miyo Terao Morita, Moritaka Nakamura, Masao Tasaka Molecular genetic study of shoot gravitropism in Arabidopsis. 第 45 回日本生物物理学学会年会シンポジウム 2007 年 12 月 21-23 日, 横浜
 - ⑦. 森田 (寺尾) 美代 第 16 回バイオイメーシング学会学術集会 (招待講演) 「重力を感じる仕組みを探る - 植物の重力感受細胞を視る」 2007 年 10 月 31 日 東京理科大学
 - ⑧. Miyo T. Morita, Moritaka Nakamura, Chieko Saito, Akihiko Nakano and Masao Tasaka *endodermal-amyloplast less 1* is a novel allele of *SHORT-ROOT*. The 18th International Conference on Arabidopsis Research, June 20-23, 2007, Beijing.
 - ⑨. 森田 (寺尾) 美代 新濱充, 橋口泰子, 田坂昌生 高等植物の重力感受に関わる小胞輸送の分子遺伝学的研究. 日本分子生物学会シンポジウム 2006 年 12 月 6-8 日, 横浜
 - ⑩. Miyo Terao Morita, Mitsuru Niihama, and Masao Tasaka Molecular Genetic Study Of Vesicular Trafficking Involved In Gravitropism In Arabidopsis. The 53rd NIBB Conference Dynamic Organelles in Plants, June 14-17 2006, Okazaki
 - ⑪. 森田美代, 倉増紀予子, 加藤壮英, 田坂昌生. 植物の重力感受に必要な液胞機能に関与する分子ネットワーク: 液胞膜の動的性質の重要性. 第 46 回日本植物生理学会年会シンポジウム 2005 年 3 月 24-26 日, 新潟
 - ⑫. Miyo Terao Morita, Keitaro Sakaguchi, Sinichiro Kiyose, Masao Tasaka. Genetic analysis of the inflorescence stem

gravitropism in Arabidopsis. Gordon Research Conferences, July 24-29 2005, New England

- ⑬. Miyo T. Morita, Shinichiro Kiyose, Takehide Kato, and Masao Tasaka Molecular genetic characterization of SGR5 encoding a zinc-finger protein required for gravitropism of Arabidopsis. The 15th International Conference on Arabidopsis Research, July 9-13, 2004, Berlin

〔図書〕 (計 2 件)

- ①. Harrison, B.R., Morita, M.T., Masson, P.H., and Tasaka, M. (2007) Signal transduction in gravitropism. *In Plant Tropism* (Blackwell Publishing) p.21- 45. 2007.
- ②. 森田 (寺尾) 美代 「重力屈性における重力感受」 *Advanced Biomimetics Series 1 プラントミメティックス - 植物に学ぶ* (甲斐昌一, 森川弘道 監修) NTS, 344-350, 2006.

〔その他〕

ホームページ等

<http://bsw3.naist.jp/keihatsu/PROJECTS/重力屈性.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 (寺尾) 美代 (MORITA T. MIYO)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授
研究者番号: 10314535

(2) 研究分担者

田坂 昌生 (TASAKA MASAO)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授
研究者番号: 90179680

(3) 連携研究者